

09.11.2004

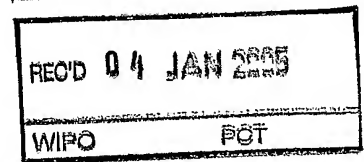
日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 0 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 9 8 0 2 2
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 9 8 0 2 2]



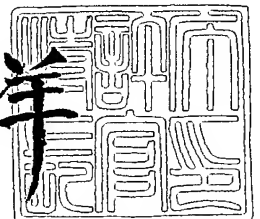
出 願 人
Applicant(s): 柳 澤 寛
榊 原 洋子

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 1 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 P04013
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 B01J 39/00
【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県名古屋市緑区亀が洞二丁目 1 0 1 0 番地 レージュ・グリー
 ン 1 0 3
 【氏名】 柳澤 寛
【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県知多郡武豊町字エケ屋敷 1 0 8 - 1 番地
 【氏名】 榊原 洋子
【特許出願人】
 【住所又は居所】 愛知県名古屋市緑区亀が洞二丁目 1 0 1 0 番地 レージュ・グリー
 ン 1 0 3
 【氏名又は名称】 柳澤 寛
【特許出願人】
 【住所又は居所】 愛知県知多郡武豊町字エケ屋敷 1 0 8 - 1 番地
 【氏名又は名称】 榊原 洋子
【代理人】
 【識別番号】 100095577
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小西 富雅
【選任した代理人】
 【識別番号】 100100424
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 中村 知公
【選任した代理人】
 【識別番号】 100114362
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 萩野 幹治
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 045908
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下のステップを含んでなる、糖タンパク質の分離方法:

a) 高いイオン強度、且つ pH が目的糖タンパク質の等電点付近にない第 1 条件下で、目的糖タンパク質を含む試料をイオン交換体に接触させる吸着ステップ; 及び

b) 前記イオン交換体に吸着された成分を、イオン強度が前記第 1 条件よりも低く、且つ pH が前記第 1 条件よりも前記等電点側にある第 2 条件下で溶出する溶出ステップ。

【請求項 2】

ステップ a とステップ b との間に以下のステップを実施する、請求項 1 に記載の糖タンパク質の分離方法:

c) 前記イオン交換体に吸着された目的糖タンパク質が溶出されない条件下で前記イオン交換体を洗浄するステップ。

【請求項 3】

前記ステップ c が、前記第 1 条件と実質的に同一の条件下で実施される、請求項 2 に記載の糖タンパク質の分離方法。

【請求項 4】

前記第 1 条件の pH が目的糖タンパク質の等電点よりも低く、

前記イオン交換体が陽イオン交換体であり、

前記第 2 条件の pH が目的糖タンパク質の等電点付近又は等電点よりも高い、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。

【請求項 5】

前記第 1 条件の pH が目的糖タンパク質の等電点よりも高く、

前記イオン交換体が陰イオン交換体であり、

前記第 2 条件の pH が目的糖タンパク質の等電点付近又は等電点よりも低い、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。

【請求項 6】

前記第 1 条件が、0.05M 以上の緩衝液を使用することを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。

【請求項 7】

前記第 1 条件が、弱酸及び弱塩基の組み合わせからなる高濃度の緩衝液を使用することを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。

【請求項 8】

前記緩衝液がトリス・コハク酸緩衝液である、請求項 7 に記載の糖タンパク質の分離方法。

【請求項 9】

前記第 2 条件が、前記第 1 条件で使用する緩衝液と同一の酸及び同一の塩基の組合せからなる緩衝液を使用することを含む、請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。

【請求項 10】

前記第 2 条件が、pH が目的糖タンパク質の等電点付近にある緩衝液を使用することを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。

【請求項 11】

前記試料が複数種類の目的糖タンパク質を含み、

ステップ b が、各目的糖タンパク質の等電点に対応した溶液条件で連続的に溶出するステップからなる、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖タンパク質の分離方法

【技術分野】

【0001】

本発明は糖タンパク質の等電点を利用した分離方法及びその応用に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、タンパク質、糖タンパク質を分離精製する方法としては、塩析、ゲルろ過(分子ふるい)、精製する物質の物理化学的特性を利用した各種クロマトグラフィーを組み合わせる手法が一般的であり、特に糖タンパク質精製にはレクチンを用いたアフィニティー・クロマトグラフィーが有効とされてきた。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかし、分離精製方法によっては、抽出したい物質の回収率の低下や抽出物の変質を引き起こし、また操作方法が煩雑であるなどの問題がある。

さらに、糖タンパク質の精製に有効とされるレクチン・アフィニティー・クロマトグラフィー法は、当該糖タンパク質の糖鎖の類型ごとにレクチンを選択する必要がある、目的糖タンパク質の糖鎖の類型判別が事前に必要となる。また、一般に分離精製にかかるコストが高いことが欠点である。

本発明は、以上の課題の少なくとも一つを解決することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

以上の目的の下、本発明者らは、タンパク質の分離精製法として用いられている等電点クロマトグラフィーに注目した。等電点クロマトグラフィーはタンパク質の等電点を利用して分離する手法であり、支持体へ目的タンパク質を吸着させるステップ及び支持体から目的タンパク質を溶出するステップを含む。従来の等電点クロマトグラフィー法では、支持体への吸着操作を低イオン強度下で実施し、イオン強度を高くすることによって溶出するのが通常である。ところが、一般にイオン強度が低いほど目的物質を吸着させる可能性は高いが、目的物質以外の吸着可能性も高くなると考えられる。本発明者らはかかる点に着目して、糖タンパク質を分離する際の条件について検討を重ねた。その結果、吸着操作を高イオン強度下で実施し、そして溶出操作を低イオン強度下で実施するという、従来の常識とは相反する条件とすることによって、試料中の糖タンパク質を特異的に分離・回収することが可能であるとの知見を得た。本発明は以上の成果に基づいて完成されたものであって、次の構成を提供する。

〔1〕以下のステップを含んでなる、糖タンパク質の分離方法：

a) 高イオン強度、且つpHが目的糖タンパク質の等電点付近にない第1条件下で、目的糖タンパク質を含む試料をイオン交換体に接触させる吸着ステップ；及び

b) 前記イオン交換体に吸着された成分を、イオン強度が前記第1条件よりも低く、且つpHが前記第1条件よりも前記等電点側にある第2条件下で溶出する溶出ステップ。

〔2〕ステップaとステップbとの間に以下のステップを実施する、〔1〕に記載の糖タンパク質の分離方法：

c) 前記イオン交換体に吸着された目的糖タンパク質が溶出されない条件下で前記イオン交換体を洗浄するステップ。

〔3〕前記ステップcが、前記第1条件と実質的に同一の条件下で実施される、〔2〕に記載の糖タンパク質の分離方法。

〔4〕前記第1条件のpHが目的糖タンパク質の等電点よりも低く、

前記イオン交換体が陽イオン交換体であり、

前記第2条件のpHが目的糖タンパク質の等電点付近又は等電点よりも高い、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。

- [5] 前記第1条件のpHが目的糖タンパク質の等電点よりも高く、
前記イオン交換体が陰イオン交換体であり、
前記第2条件のpHが目的糖タンパク質の等電点付近又は等電点よりも低い、[1]～[3]のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。
- [6] 前記第1条件が、0.05M以上の緩衝液を使用することを含む、[1]～[5]のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。
- [7] 前記第1条件が、弱酸及び弱塩基の組み合わせからなる高濃度の緩衝液を使用することを含む、[1]～[6]のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。
- [8] 前記緩衝液がトリス・コハク酸緩衝液である、[7]に記載の糖タンパク質の分離方法。
- [9] 前記第2条件が、前記第1条件で使用する緩衝液と同一の酸及び同一の塩基の組合せからなる緩衝液を使用することを含む、[6]～[8]のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。
- [10] 前記第2条件が、pHが目的糖タンパク質の等電点付近にある緩衝液を使用することを含む、[1]～[9]のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。
- [11] 前記試料が複数種類の目的糖タンパク質を含み、
ステップbが、各目的糖タンパク質の等電点に対応した溶液条件で連続的に溶出するステップからなる、[1]～[10]のいずれかに記載の糖タンパク質の分離方法。

【発明の効果】**【0005】**

本発明の方法では、イオン強度が高い条件で吸着操作（及び洗浄操作）を行うため、支持体（イオン交換体）への不要物質の吸着を効率的に阻害できる。また、溶出時にイオン強度を下げるという設定は、イオン強度上昇による不要物質の溶出を防除するため、目的糖タンパク質を特異的に溶出するために有効な溶出条件である。このような条件を採用した本発明によれば、短時間で、かつ簡便な操作で目的の糖タンパク質を分離精製することができる。

【発明を実施するための最良の形態】**【0006】**

本発明は糖タンパク質の分離方法に関し、以下のステップa及びbを含むことを特徴とする。

a) 高イオン強度、且つpHが目的糖タンパク質の等電点付近にない第1条件下で、目的糖タンパク質を含む試料をイオン交換体に接触させる吸着ステップ。

b) 前記イオン交換体に吸着された成分を、イオン強度が前記第1条件よりも低く、且つpHが前記第1条件よりも前記等電点側にある第2条件下で溶出する溶出ステップ。

本発明において、分離対象となる糖タンパク質の種類は特に限定されない。例えば、卵白アルブミン、ジアミノオキシダーゼ、トランスフェリン等を分離対象とすることができる。後述の実施例に示すように本発明の方法によれば、その分離を試みた卵白アルブミン、ジアミノオキシダーゼ、及びトランスフェリンの全てについて分離に成功した。このように、本発明は多種多様な糖タンパク質の分離に利用できる方法である。

【0007】

本発明において「分離方法」とは、試料中から目的の糖タンパク質を分離することをいうが、ここでの分離は、精製の概念を含む用語として使用する。また、試料中から糖タンパク質を分離することは逆に言えば試料中から糖タンパク質以外を分離することであるから、本発明は試料中から糖タンパク質以外の成分を分離することにも利用できる。具体的には例えば、タンパク質とそれに糖鎖が付加されてなる糖タンパク質とが試料中に共存する場合においてタンパク質を分離することに本発明を利用することもできる。

【0008】

ステップaは、高イオン強度且つpHが目的糖タンパク質の等電点付近にない条件（第1条件）で実施される。このステップにおける試料とイオン交換体との接触は、典型的には、カラムに詰めたイオン交換体に試料を添加することによって実施される。通常、事前に

適当な緩衝液で平衡化したカラムに試料を添加する。このようなカラムクロマトグラフィーの形態を採用すれば、吸着操作から溶出操作までを連続的に実施することが容易となる。一方、カラム等の特別の容器に充填していないイオン交換体に対して試料を直接添加し、目的糖タンパク質とイオン交換体との接触を実施してもよい。このようなバッチ式の処理方法は、一度に大量の試料を処理することが容易になるという利点を有する。

【0009】

ステップ a は高イオン強度下で実施される。本発明者らの検討によって、高イオン強度下で吸着操作を実施すれば、夾雑物の吸着を阻害できること、即ち試料中の糖タンパク質を特異的に吸着できることが判明した。従来の等電点クロマトグラフィーでは、例えば 20 mM の緩衝液が使用されるなど、低イオン強度下で吸着操作が実施される。本発明では、このような低イオン強度下ではなく、例えば 0.1M という高濃度のトリス・コハク酸緩衝液を使用する条件など、従来の条件に比較して非常に高いイオン強度下で吸着操作を実施することを特徴の一つとする。本発明における「高イオン強度」とは、一般に目的糖タンパク質の種類やそれを含む試料の種類、或いは使用する緩衝液の種類などによって異なるが、弱酸と弱塩基の組合せからなる緩衝液を使用するとして例えば約 0.05M 以上、好ましくは約 0.075M 以上、より好ましくは約 0.1M 以上、更に好ましくは 0.2M 以上である。上限値は特に限定されず、例えばその濃度が約 0.05M～約 1.5M、約 0.075M～約 1.0M、又は約 0.1M～約 0.5M の範囲にある緩衝液を採用することができる。

【0010】

分離目的の糖タンパク質（以下、「目的糖タンパク質」という）の等電点などを考慮してイオン交換体が選択される。陽イオン交換体を使用する場合には、イオン交換体への目的糖タンパク質の吸着を確保するために、目的糖タンパク質が正に荷電する条件、即ち目的糖タンパク質の等電点よりも低い pH 条件（低 pH 条件）で吸着操作を実施する。ここでの低 pH 条件は目的糖タンパク質の等電点によって異なり、目的糖タンパク質の等電点が pH4.5 の場合を例に採れば、例えば 4.0～4.3 に設定することができる。また、試料中に複数の目的糖タンパク質が混在し、これらを連続的に分離ないし回収する場合には、全ての目的糖タンパク質が正に荷電するように pH 条件を設定する。例えば等電点がそれぞれ pH4.2、4.5、6.2 の目的糖タンパク質が混在する場合においては、例えば pH4.0～4.1 の条件下で吸着操作を実施することができる。

一方、陰イオン交換体を使用する場合には上記同様に、目的糖タンパク質が負に荷電する条件、即ち目的糖タンパク質の等電点よりも高い pH 条件（高 pH 条件）で吸着操作を実施する。

以上のように、pH が目的糖タンパク質の等電点付近にない条件とすることによって、イオン交換体に目的糖タンパク質を吸着させる。

【0011】

吸着時の pH を設定するにあたっては、目的タンパク質の pH 安定性を考慮することが好ましい。即ち、活性を保持した状態で目的糖タンパク質を分離する必要がある場合には、失活ないし活性の低下がない範囲内の pH 条件とすることが好ましい。

【0012】

イオン交換体の種類は特に限定されない。例えば、スチレン系、アクリル系、メタアクリル系、フェノール系、脂肪族系、ピリジン系、デキストラン系、又はセルロース系の基材に、陽イオン、陰イオン又は両性イオン交換基が導入されたイオン交換体（樹脂）を使用することができる。陽イオン交換基として例えばカルボキシル基（CM）や硫酸基（SM、MonoS など）、陰イオン交換基としては例えばアミノ基（DEAE、QAE、MonoQ など）が使用される。多種多様なイオン交換体が市販されており（例えば生化学工業株式会社、アマシャム バイオサイエンス株式会社などが販売している）、本発明では適当な特性を備える市販のイオン交換体を利用することができる。

【0013】

試料の吸着時に使用する緩衝液として、弱酸及び弱塩基の組合せからなるもの（トリス・コハク酸緩衝液、トリス・クエン酸緩衝液、トリス・酢酸緩衝液など）を使用すること

が好ましい。かかる特性の緩衝液を使用すれば、それを構成する酸又は塩基の濃度を低下させることによって、後述の溶出条件（第2条件）で使用される、低イオン強度かつpHが第1条件よりも目的タンパク質の等電点側にある緩衝液を調製できる。従って、酸及び塩基の組合せの異なる複数種類の緩衝液を用意する必要がなくなる。また、緩衝液の酸又は塩基の比率の変更のみによって吸着操作（及び洗浄操作）から溶出操作への移行が可能となることから全体の操作が一層簡便となり、また、一連の操作を連続的に実施することが可能となる。

尚、吸着操作に先立ってイオン交換体を平衡化する場合には通常、吸着操作と同一の緩衝液を使用する。

【0014】

ステップaの後、溶出ステップ（ステップb）を実施する。この溶出ステップは、イオン強度が第1条件よりも低く、且つpHが第1条件よりも目的糖タンパク質の等電点側にある第2条件下で実施される。この第2条件ではまず、イオン強度が第1条件のそれよりも低く設定される。本発明の方法はこのように吸着操作を高イオン強度下で行い、溶出操作を低イオン強度で行うことを特徴とするものであり、当該特徴によって糖タンパク質を特異的に分離できるとう作用・効果が得られる。即ち、溶出時のイオン強度を低くすることによれば、イオン交換体に吸着された不要成分の溶出を防除できる。即ち、目的糖タンパク質を特異的かつ効率的に溶出することが可能となる。

第2条件におけるイオン強度は、第1条件におけるイオン強度よりも低いことを必要条件として、その他の諸条件（目的糖タンパク質の種類やそれを含む試料の種類、或いは使用する緩衝液の種類など）を考慮して設定することができる。例えば、弱酸と弱塩基の組合せからなる緩衝液を使用するとしてその濃度が、約0.05M～約1.5Mの範囲内、好ましくは約0.075M～約1.0Mの範囲内、更に好ましくは約0.1M～約0.75Mの範囲内において第1条件の場合よりも低くなるように第2条件を設定する。

【0015】

次に、第2条件では、pHが第1条件よりも目的糖タンパク質の等電点側に設定される。具体的には、イオン交換体として陽イオン交換体を使用して吸着ステップを実施する場合には、第2条件におけるpHを目的糖タンパク質の等電点付近又は等電点よりも高く設定する。他方、イオン交換体として陰イオン交換体を使用して吸着ステップを実施する場合には、第2条件におけるpHを目的糖タンパク質の等電点付近又は等電点よりも低く設定する。

【0016】

溶出ステップでは、以上の第2条件を満たす溶出液を用意し、それを吸着ステップ後のイオン交換体に接触させる。吸着ステップに供した試料が複数種類の目的糖タンパク質を含む場合には、各目的糖タンパク質の等電点に対応した溶液条件で連続的に溶出することによって、連続的にこれら複数の目的糖タンパク質を溶出することができる。

【0017】

吸着ステップで使用した緩衝液と全く異なる組成の緩衝液を溶出液として用いることもできるが、吸着ステップで使用した緩衝液において酸及び塩基のいずれかの濃度を低下させる（他方の濃度はそのままに維持することが好ましい）ことで得られる緩衝液を使用することが好ましい。このような態様では、吸着ステップで使用する緩衝液と同一の酸及び同一の塩基の組合せからなる緩衝液を使用して溶出ステップを実施することとなる。この態様によれば第2条件の一つ、即ち低イオン強度であることを満たすのと同時にもう一つの条件、即ちpHが第1条件よりも目的糖タンパク質の等電点側にあることを満たすことができる。即ち、例えば吸着操作で使用した緩衝液のpHが目的糖タンパク質の等電点よりも低い場合には、緩衝液を構成する酸の濃度を低下させることによって、イオン強度が低下し、併せてpHが目的糖タンパク質の等電点側へとシフト（高pHへのシフト）し、第2条件を満たす環境が得られる。同様に、吸着操作で使用した緩衝液のpHが目的糖タンパク質の等電点よりも高い場合には、緩衝液を構成する塩基の濃度を低下させることによって、イオン強度が低下し、併せてpHが目的糖タンパク質の等電点側へとシフト（低pHへのシフト

し、第2条件を満たす環境が得られる。以上の態様（使用する緩衝液中の酸又は塩基の濃度を変化させる態様）によれば、イオン強度の低下及びpHの調整を同時にそして簡便な操作で達成することができる。しかも、連続的なイオン強度の低下及びpHの調整も簡便な操作によって可能となることから、特に、試料中に等電点の異なる複数の糖タンパク質が混在しており、それらをそれぞれ分離ないし分取する場合において特に有効な態様となる。

【0018】

吸着ステップ（ステップa）と溶出ステップ（ステップb）の間に洗浄ステップ（ステップc）を実施することが好ましい。この洗浄ステップは、吸着ステップの結果としてイオン交換体に吸着した不要成分（試料中の目的糖タンパク質以外の成分）を洗浄、除去する目的で行う。従って、不要成分を効果的に除去でき、且つイオン交換体に吸着された目的糖タンパク質が溶出されない条件を満たす洗浄液を使用することが好ましい。例えば、当該ステップとして、吸着操作に使用した緩衝液と同一組成の緩衝液（即ち実施的に同一条件）でイオン交換体を洗浄する。勿論、洗浄効果を高めることを目的として、緩衝液の組成を適宜変更したものを洗浄液として用いてもよい。また、適当な塩を少量付加した緩衝液を洗浄液としてもよい。良好な洗浄効果が得られるように、十分な量の洗浄液で洗浄することが好ましい。例えば、カラムに充填したイオン交換体を使用する場合、イオン交換体の2倍量（体積基準）～30倍量、好ましくは3倍量～20倍量の洗浄液を使用して当該ステップを実施する。

【0019】

本発明の方法を実施する際の温度条件は特に限定されないが、一般に室温又は低温（例えば4℃～10℃）で一連の操作を行う。

以下、本発明に関する実施例（実験例を含む）を説明する。

【実施例1】

【0020】

<ジアミンオキシダーゼの簡易精製法の検討>

エンドウのジアミンオキシダーゼ（以下、「DAO」という）をモデルとして、等電点を利用した糖タンパク質の簡易精製法の開発を試みた。具体的には以下の手順でDAOの分離精製を試み、その結果を評価した。

a. 材料と方法

陽イオン交換体であるSPセファデックスを詰めたカラム（SPセファデックスC-50（アマシヤム バイオサイエンス株式会社）2.5 x 6 cm）を用意し、これを0.1Mトリス・コハク酸緩衝液（pH6.5）で平衡化した。一方、エンドウを0.2Mトリス・コハク酸緩衝液（pH7.5）で破碎抽出しナイロン・メッシュ（74 μ m）を通して大きな未破碎成分や不溶成分を取り除いた後、酵素液のpHを飽和コハク酸でpH6.5とすると同時に使用した緩衝液量の2倍になるように蒸留水を加えた。この酵素溶液を遠心分離（15,000g 20分）し、その上澄み区分をとった（ステップ1：粗酵素液）。次に、この粗酵素液をカラムに添加した。添加後、カラムに20倍量（対カラムの体積）の0.1Mトリス・コハク酸緩衝液（pH6.5）を通した。次に、0.1Mトリス・コハク酸緩衝液（pH8.0）で酵素を溶出した。フラクションコレクター（モデル2110、バイオラッド社）を用いて溶出成分を分画した（1画分あたり5.1ml）。

b. 結果

以上の手順で実施したクロマトグラフィーの結果を図1のグラフに示す。横軸は画分番号（時間軸）、縦軸は280nmでのOD（左）と、DAO活性（右）である。画分5付近にOD280及びDAO活性のピークが認められる。画分3～11をまとめて最終精製物（ステップ2：最終精製物）とした。粗酵素液、及び最終精製物について全タンパク質量、DAO活性量（比活性）、精製度（粗酵素液の比活性を1としたときの比活性）、収量を測定し比較した（図2の表）。最終精製物では、比活性が1.38 μ kat/mg、精製度が115であって、従来の方法（図2の表の下段）と遜色ないレベルであった。収量については88.7%であって、従来の方法に比べて格段に高い。

純度を確認するために最終精製物をSDS電気泳動に供した。その結果、銀染色レベルで均一なバンドが確認された（結果を図示せず）。

以上の結果から、エンドウ破碎抽出物ろ過液は、0.1Mトリス・コハク酸緩衝液(pH6.5)でカラムにのせ洗浄するとほとんどの不要物質が吸着されずに流出し、0.1Mトリス・コハク酸緩衝液(pH8.0)で溶出するとDAOが単離できることがわかった。

c. 評価

エンドウのジアミンオキシダーゼ (DAO) は、1994年McGuireらによって精製方法が確立された糖タンパク質である。彼らの精製方法は、植物体からの破碎抽出、硫酸沈殿、有機溶媒沈殿、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過、ヒドロキシアパタイト・カラムクロマトグラフィーによる方法で、沈殿、透析を繰り返しながら不純タンパク質を分離排除し、さらにタンパク質の電気的性質や分子量の違いを利用する一般的な方法である。この手法によると、通常3～4日要するものである。

本実施例の方法、即ち、支持体として陽イオン交換体、緩衝液としてトリス・コハク酸緩衝液を用いた簡易精製法では、半日(12時間)以内という短時間で、銀染色レベルで均一なDAOを得ることに成功し、また従来法と同程度以上の回収率を示した。

【実施例2】

【0021】

<糖タンパク質の吸着特性の検討>

(1) 卵白アルブミンの分離精製

DAOの精製に有効であると確認された簡易精製法の手法が、他の糖タンパク質の精製にも適用できるか否かを検証するために、13種類のタンパク質・糖タンパク質の存在が確認されている卵白を試料に用いて、支持体への吸着性等について明らかにした。

a. 材料及び方法

陽イオン交換体であるCMセファデックスを詰めたカラム (CMセファデックスC-50 (アマシャム バイオサイエンス株式会社) 1.6 x 6 cm) を用意し、これを0.1Mトリス・コハク酸緩衝液 (pH4.0) で平衡化した。一方、卵白をメスシリンダーに取り、その5倍量の蒸留水を加え、30分間攪拌した。この溶液から20mLを取って、0.2Mトリス・コハク酸緩衝液 (pH7.5) 50mLを加えた後、飽和コハク酸を加えpHを4.0にした。さらにこの溶液全体を蒸留水で100mLにした (オボムチンは卵白を2～3倍量の水で希釈した場合や、pH4で処理すると沈殿するのでこれらの操作で効率的に取り除ける)。次に遠心分離 (15,000g 20分) し、その上澄み区分10mLをカラムに添加した。続いて、カラムに10倍量 (対カラムの体積) の0.1Mトリス緩衝液 (pH4.0) を通した。次に、0.1Mトリス・コハク酸緩衝液 (pH4.5) を通し、280nmのODが0.1以下になったところで、さらに0.1Mトリス・コハク酸緩衝液 (pH8.0) を通した。フラクションコレクター (モデル2110、バイオラッド社) を用いて溶出成分を分画した (1画分あたり5.1ml)。

b. 結果

以上の手順で実施したクロマトグラフィーの結果を図3のグラフに示す。横軸は画分番号 (時間軸)、縦軸は280nmでのODである。画分22～36付近に280nmのピークが認められる。画分22～36をまとめて最終精製物とした。SDS電気泳動に供したところ、銀染色レベルで均一のバンドが認められた (図4)。他の陽イオン交換体を用いて同様の手順で精製した場合にも、類似の傾向が認められた (結果を図示せず)。

c. 評価

卵白に最も多量に含まれる卵白アルブミン (等電点pH4.5) を一段階で効率的に回収することができた。

【0022】

(2) 単離方法として応用の可能性の検討

次に、複数の糖タンパク質が混在する試料から各糖タンパク質を単離する方法として、上記の簡易精製法が有効であるか否かを検討した。具体的には、複数の糖タンパク質及びタンパク質が混在する試料から各糖タンパク質を分離できるか否かを検討した。

a. 材料及び方法

糖タンパク質として卵白アルブミン（等電点pH4.5、分子量45k、シグマ・アルドリッチ株式会社）及びトランスフェリン（等電点pH6.2、分子量80k、シグマ・アルドリッチ株式会社）と、非糖タンパク質としてストレプトアビジン（全タンパク質としての等電点pH6.4、表面の等電点pH5.0～5.5、分子量60k 4量体、ナカライ規格特級GR、ナカライテスク株式会社）とを含む溶液を試料とした。4種類のイオン交換体（CMセファデックスC-50（アマシャム バイオサイエンス株式会社）、CMセファローズFast Flow（アマシャム バイオサイエンス株式会社）、SPセファデックスC-50（アマシャム バイオサイエンス株式会社）、SPセファローズFast Flow（アマシャム バイオサイエンス株式会社））を使用し、それぞれについて実施例1と同様の手順で試料の添加（0.1Mのトリス・コハク酸緩衝液（pH4.0））及び洗浄（0.1Mのトリス・コハク酸緩衝液（pH4.0））を行った。溶出時の溶液条件は、コハク酸濃度の連続的な減少による約pH4.0～約pH9.0のグラジエントとした。

b. 結果

卵白アルブミン、トランスフェリン、及びストレプトアビジンを含む溶液を試料とした、CMセファデックス、CMセファローズ、SPセファデックス、及びSPセファローズによるクロマトグラフィーの結果を図5～8のグラフに示す。各グラフにおいて横軸は画分番号（時間軸）、縦軸は280nmでのOD（左）及び溶出液のpH（右）である。図5のグラフでは画分26付近に卵白アルブミンのピーク、画分37付近にストレプトアビジンのピーク、そして画分39付近にトランスフェリンのピークがそれぞれ認められる。同様に、図6のグラフでは画分16付近に卵白アルブミンのピーク、画分35付近にストレプトアビジンのピーク、そして画分38付近にトランスフェリンのピークがそれぞれ認められる。同様に、図7のグラフでは画分13付近に卵白アルブミンのピーク、画分28付近にストレプトアビジンのピーク、そして画分37付近にトランスフェリンのピークがそれぞれ認められる。同様に、図8のグラフでは画分19付近に卵白アルブミンのピーク、画分31付近にストレプトアビジンのピーク、そして画分38付近にトランスフェリンのピークがそれぞれ認められる。

【0023】

c. 評価

2種類の糖タンパク質と非糖タンパク質（ストレプトアビジン）は、高イオン強度のトリス・コハク酸緩衝液を使用することによって、試したすべてのイオン交換体に吸着し、等電点付近で溶出した。図7や図8に示されるように、複数種類の糖タンパク質が混在する試料を用いた場合においても、個々の糖タンパク質を高精度で分離できることが確認された。尚、この実験例の条件では、非糖タンパク質であるストレプトアビジンについてもイオン交換体への吸着性が認められた。但し、試験に供したN型糖タンパク質は高い吸着性、及び良好な溶出性を示し、本発明の方法が汎用性に優れること、即ち、様々な糖タンパク質の分離精製に本発明の方法を適用可能であることが実証された。

【0024】

(3) 緩衝液濃度の影響の検討

上記(2)の実験では、吸着用及び洗浄用緩衝液として0.1Mトリス・コハク酸緩衝液を使用した。緩衝液の濃度（イオン強度）と、イオン交換体への吸着特性及び溶出特性との関係を調べるために、0.2Mトリス・コハク酸緩衝液（pH4.0）を用いて、(2)と同様の実験を実施した。

a. 材料及び方法

吸着及び洗浄用として0.2Mトリス・コハク酸緩衝液（pH4.0）を用い、溶出はコハク酸濃度の連続的な減少による約pH4.0～約pH9.0のグラジエントとした。試料としては、卵白アルブミン（等電点pH4.5、分子量45k、シグマ・アルドリッチ株式会社）、トランスフェリン（等電点pH6.2、分子量80k、シグマ・アルドリッチ株式会社）及びストレプトアビジン（全タンパク質としての等電点pH6.4、表面の等電点pH5.0～5.5、分子量60k 4量体、非糖タンパク質、ナカライ規格特級GR、ナカライテスク株式会社）を混合したものを試料とした。イオン交換体としてはCMセファデックスを使用した。その他の実験方法は上記(2)と同様とした。

b. 結果

クロマトグラフィーの結果を図9に示す。図9のグラフにおいて横軸は画分番号（時間軸）、縦軸は280nmでのODである。画分16付近に卵白アルブミンのピーク、画分38付近にトランスフェリンのピークが認められる。非糖タンパク質ストレプトアビジンはイオン交換体に吸着せず、素通りした。

c. 考察

緩衝液として0.2Mトリス・コハク酸緩衝液を用いた場合、糖タンパク質はすべて吸着したが、非糖タンパク質であるストレプトアビジンは吸着されず流出した。即ち、使用する緩衝液の濃度を適宜調整することによって、糖タンパク質を特異的にイオン交換体に吸着させ、そして溶出できることが示された。このように、本発明の簡易精製法は、糖タンパク質を特異的に分離精製する方法として有効である。

一方、(2)の結果を考え合わせると、条件によっては非糖タンパク質も糖タンパク質同様にイオン交換体への吸着性を示すが、糖タンパク質の方が、より吸着力が強い傾向があるといえる。従って、吸着時の条件を、非糖タンパク質がイオン交換体に吸着できない高イオン強度に設定すれば、糖タンパク質を特異的に吸着させることができる。即ち、非糖タンパク質が吸着されないイオン強度で吸着操作を実施することにすれば、非糖タンパク質が混在する試料からも糖タンパク質を良好に分離精製することができる。

【実施例3】**【0025】****＜緩衝液の組成と吸着性の関係の検討＞**

緩衝液の種類によって、糖タンパク質のイオン交換体への吸着性がどのように変動するかを検討した。トリス・酢酸緩衝液、トリス・クエン酸緩衝液を試験対象とした。

a. 材料及び方法

吸着及び洗浄用として0.1Mトリス・酢酸緩衝液（pH4.0）を用い、溶出を酢酸濃度の連続的な減少による約pH4.0～約pH9.0のグラジエントとした場合（条件1）と、吸着及び洗浄用としてトリス・クエン酸緩衝液（pH4.0）を用い、溶出をクエン酸濃度の連続的な減少による約pH4.0～約pH9.0のグラジエントとした場合（条件2）を比較した。試料としては、卵白アルブミン、トランスフェリン及びストレプトアビジンを用いた。イオン交換体としてはCMセファデックスを使用した。

b. 結果

条件1のクロマトグラフィーの結果を図10に、条件2のクロマトグラフィーの結果を図11にそれぞれ示す。図10及び図11のグラフにおいて横軸は画分番号（時間軸）、縦軸は280nmでのOD（左）及び溶出液のpH（右）である。図10のグラフでは、画分32付近にカラムに負荷した全タンパク質のピークが認められる。同様に図11のグラフでは、画分番号27付近にカラムに負荷した全タンパク質のピークが認められる。

c. 考察

トリス・酢酸緩衝液を用いた場合、トリス・クエン酸緩衝液を用いた場合のいずれにおいても、糖タンパク質のイオン交換体への良好な吸着及び溶出が認められた。このように、本発明の方法において様々な緩衝液を使用することが可能であることが示された。従って、目的糖タンパク質の等電点、共存する他の糖タンパク質や非糖タンパク質の等電点、或いはそれらの含有量、抽出後の目的タンパク質の使用目的等を考慮して、適切な緩衝液を選択することができる。

【0026】

以上の実施例で示されるように、本発明の方法は、多種類のタンパク質・糖タンパク質が混在する雑駁なサンプルから、非常に短時間で、簡便に、目的タンパク質、糖タンパク質を効率的に回収できる手法である。また、試験に供した糖タンパク質はすべて回収できたこと、あわせて糖タンパク質においてはきわめて高イオン強度条件で可逆的な吸着性を示したことから、本発明の方法は、糖タンパク質の分離精製法として普遍性が高いといえる。

【産業上の利用可能性】

【0027】

本発明は、糖タンパク質を分離・精製する方法として広範な目的に利用できる。例えば、生体試料（例えば血清）からの有用糖タンパク質（例えば疾病関連糖タンパク質）の分離・回収や、特定のタンパク質の検出（例えば、健常人と患者との間で特定の糖タンパク質量を比較し、その結果を診断材料とする）に本発明を利用できる。また、アレルギーフリーのワクチンの作製など、タンパク質又は糖タンパク質を排除する必要がある場合の分離法として本発明を利用することもできる。また、各種糖タンパク質の等電点を検出ないし認知することにも本発明を利用できる。さらに本発明は、糖鎖の有無のみが異なるタンパク質が夾雑する試料から目的の糖タンパク質を分離・精製することにも有効である。

【0028】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】図1は、エンドウのジアミノオキシダーゼを本発明の方法で精製した場合の結果（クロマトグラフィーのグラフ）である。

【図2】図2は、ジアミノオキシダーゼを本発明の方法で精製した場合の収量等を示す表である。下段には従来の方法（Purification and Characterization of Amine Oxidase from Pea Seedlings, F. Vianello, A. Malek-Mirzayans, M. Luisa Di Paolo, R. Stevanata, and A Rigo, Protein Express and Purification 15, 196-201(1999)）における収量等が示されている。

【図3】図3は、卵白を本発明の方法で精製した場合の結果（クロマトグラフィーのグラフ）である。

【図4】図4は、卵白を本発明の方法で精製して得られた最終精製物を電気泳動した結果を示す。

【図5】図5は、イオン交換体としてCMセファデックスを使用して、卵白アルブミン、トランスフェリン、及びストレプトアビジンを実験の方法で分離した結果（クロマトグラフィーのグラフ）を示す。

【図6】図6は、イオン交換体としてCMセファローズを使用して、卵白アルブミン、トランスフェリン、及びストレプトアビジンを実験の方法で分離した結果（クロマトグラフィーのグラフ）を示す。

【図7】図7は、イオン交換体としてSPセファデックスを使用して、卵白アルブミン、トランスフェリン、及びストレプトアビジンを実験の方法で分離した結果（クロマトグラフィーのグラフ）を示す。

【図8】図8は、イオン交換体としてSPセファローズを使用して、卵白アルブミン、トランスフェリン、及びストレプトアビジンを実験の方法で分離した結果（クロマトグラフィーのグラフ）を示す。

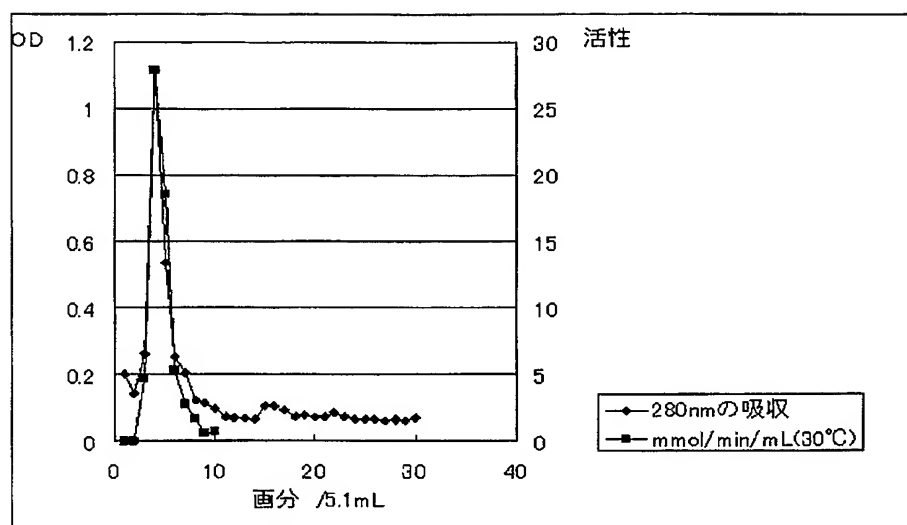
【図9】図9は、より高イオン強度の条件（0.2Mトリス・コハク酸緩衝液）で吸着を行った場合のクロマトグラフィーの結果である。

【図10】図10は、トリス・酢酸緩衝液を用いてカラムに負荷した全タンパク質を分離した結果（クロマトグラフィーのグラフ）を示す。

【図11】図11は、トリス・クエン酸緩衝液を用いてカラムに負荷した全タンパク質を分離した結果（クロマトグラフィーのグラフ）を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】

エンドウマメ上胚軸のジアミノオキシダーゼ精製(発明方法による)

ステップ	全活性 μ kat	全タンパク量 mg	比活性 μ kat/mg	精製度 倍	収集量 %
1. 粗酵素	13.3	1079	0.012	1	100
2. SP-Sephadex	11.8	8.54	1.38	115	88.7

エンドウマメ幼芽のジアミノオキシダーゼ精製(引用)

ステップ	全活性 μ kat	全タンパク量 mg	比活性 μ kat/mg	精製度 倍	収集量 %
1. 粗酵素	—	10031	0.01	1	100
2. (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	—	2970	0.04	303	98
3. DE-52 chromatography	—	114	0.66	55	63
4. 6-aminohexyl-Sepharose 2B	—	31	1.63	136	42

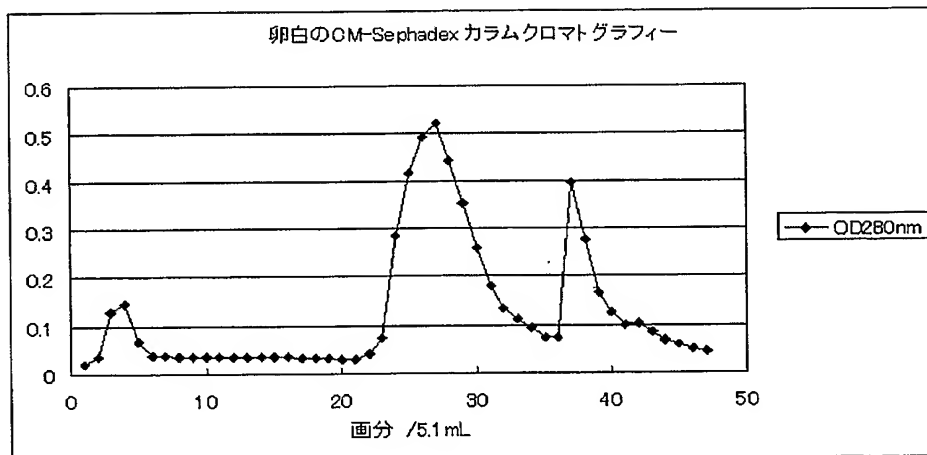
Purification and Characterization of Amine Oxidase from Pea Seedlings

F.Vianello, A.Malek-Mirzayans, M. Luisa Di Paolo, R.Stevanata, and A Rigo

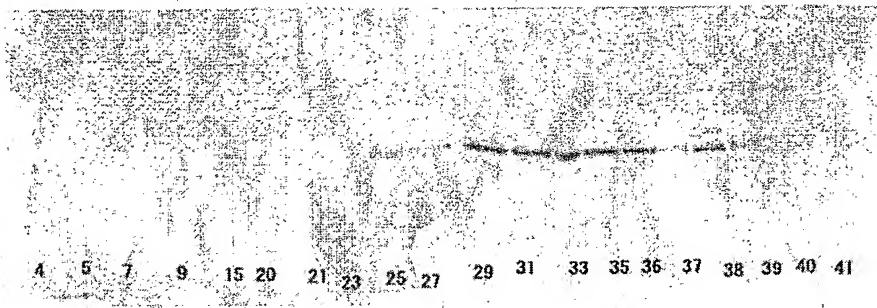
Protein Expression and Purification 15, 196-201 (1999)

(95%精製酵素の場合 1.2 μ kat/mg)

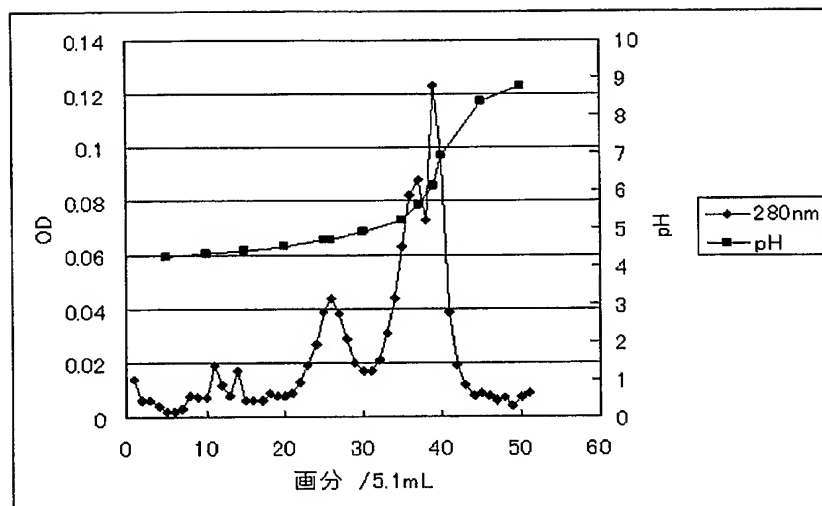
【図 3】



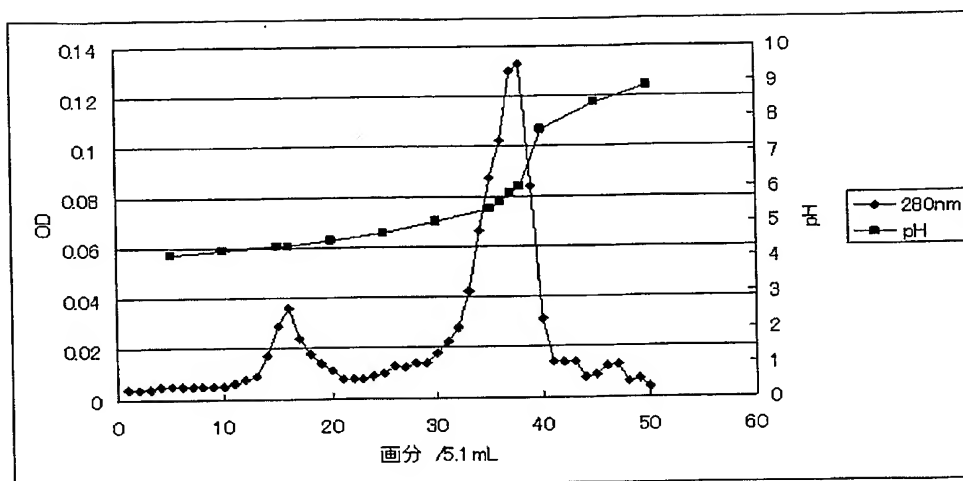
【図 4】



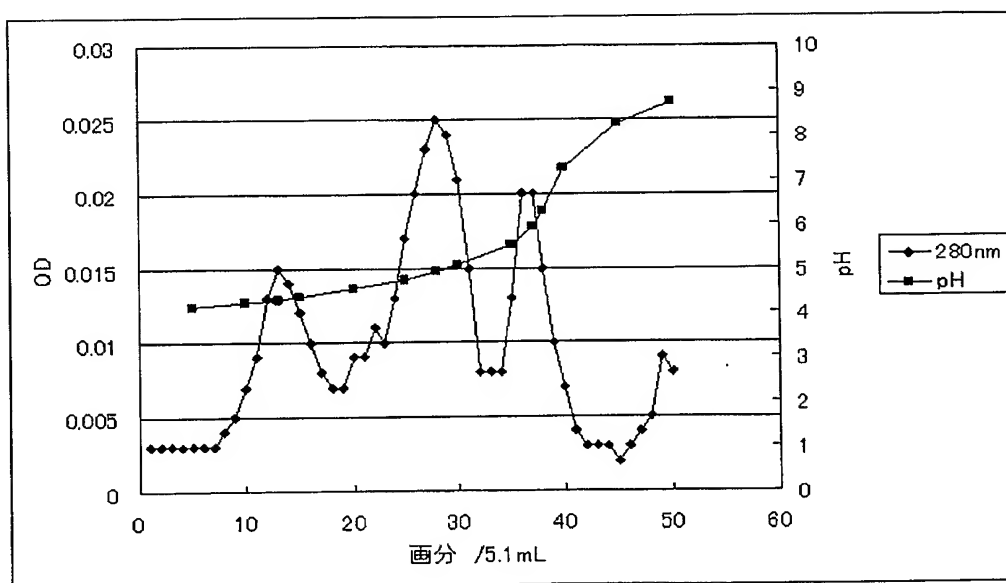
【図 5】



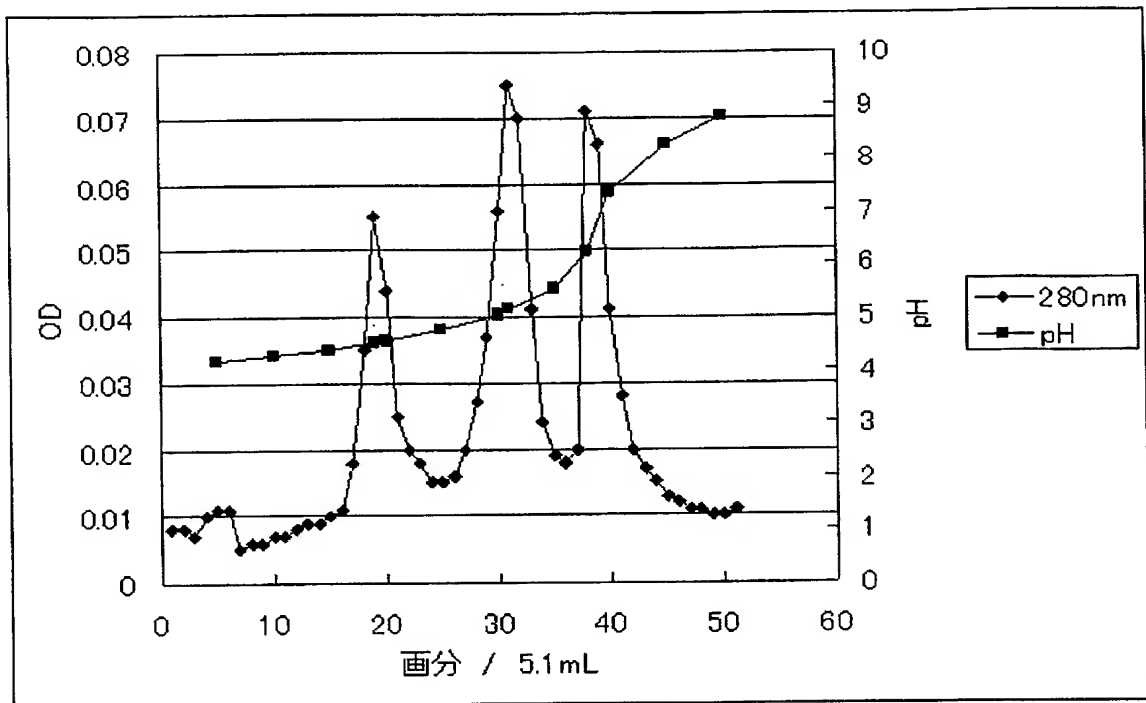
【図 6】



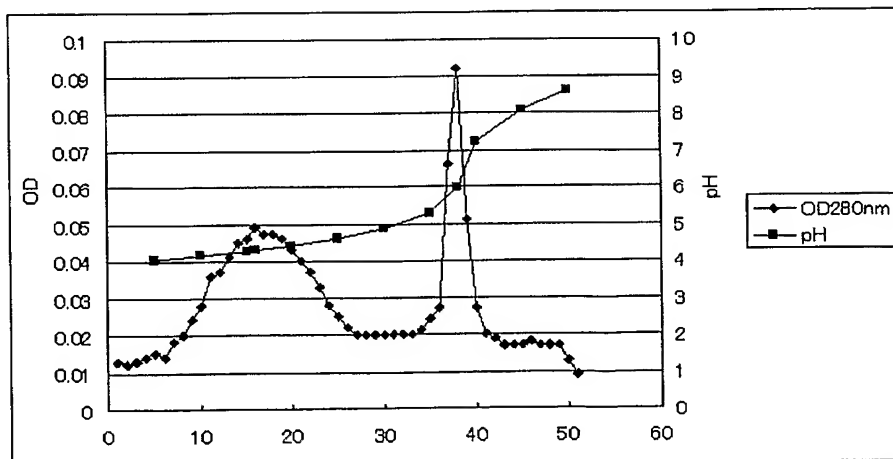
【図 7】



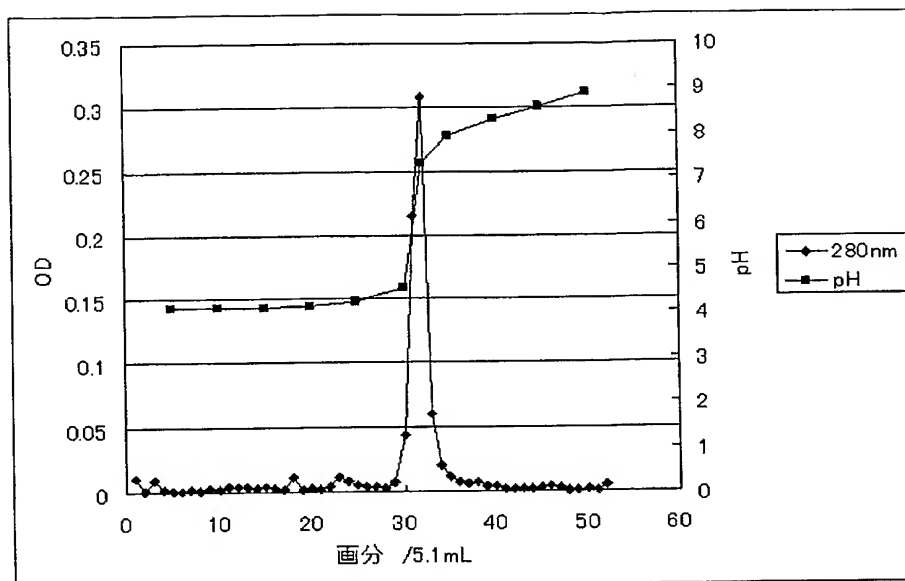
【図 8】



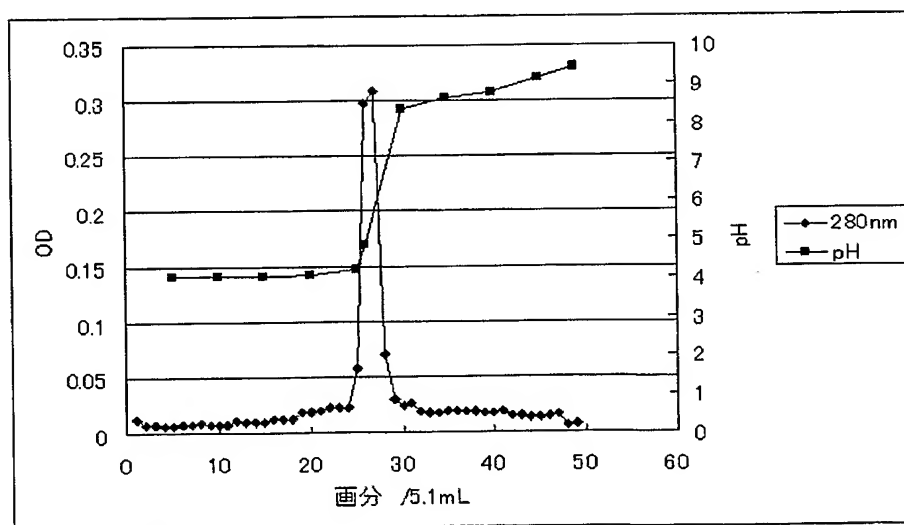
【図 9】



【図10】



【図11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡便な操作で高精度に糖タンパク質を分離精製できる方法を提供する。

【解決手段】 高イオン強度、且つpHが目的糖タンパク質の等電点付近にない第1条件下で、目的糖タンパク質を含む試料をイオン交換体に接触させる。その後、イオン交換体に吸着された成分を、イオン強度が第1条件よりも低く、且つpHが第1条件よりも目的糖タンパク質の等電点側にある第2条件下で溶出する。

【選択図】 図 2

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 9 8 0 2 2
受付番号	5 0 4 0 0 5 2 7 6 1 8
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0 0 9 5
作成日	平成 1 6 年 4 月 2 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成16年 3月30日

特願 2 0 0 4 - 0 9 8 0 2 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 4 1 2 4 8 7 5]

1. 変更年月日 2 0 0 4 年 3 月 3 0 日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市緑区亀が洞二丁目 1 0 1 0 番地 レーシュ・グ
リーン 1 0 3

氏 名 柳澤 寛

特願 2004-098022

出願人履歴情報

識別番号

[504124886]

1. 変更年月日

2004年 3月30日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛知県知多郡武豊町字エケ屋敷108-1番地

氏 名

榊原 洋子